

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590543
 研究課題名（和文） アミノ酸トランスポーターを標的とする血管障害に対する新規治療戦略
 研究課題名（英文） Novel approach to vascular injury by targeting amino acid transporter LAT1
 研究代表者
 神崎 恒一（KOZAKI KOICHI）
 杏林大学・医学部・准教授
 研究者番号：80272540

研究成果の概要（和文）：アミノ酸トランスポーターLAT1 はラットの血管平滑筋細胞および頸動脈に発現しており、平滑筋細胞の増殖と生存に必要であること、頸動脈の血管障害後内膜肥厚に深くかかわっていることがラットやマウスを用いた動物実験で明らかにすることができた。さらに慢性血管障害である動脈硬化や大脳虚血病変の形成にかかわっていることを現在モデル動物を使って検証中である。これらの研究により各種血管障害における LAT1 の重要性が明らかになりつつある。

研究成果の概要（英文）：LAT1, a transporter providing essential amino acids into the cells, is expressed in the rat aortic smooth muscle cells (RASMC), and also in the carotid artery. LAT1 is necessary for the growth and survival of RASMC. Animal experiments showed that LAT1 plays an important role in the neointima formation after vascular injury in the carotid and femoral artery. Furthermore, we are investigating the role of LAT1 in the development of atherosclerosis and in the function of blood-brain barrier.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：アミノ酸トランスポーター、LAT、血管平滑筋、頸動脈、ApoE 欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

L-type amino acid transporter 1 (LAT1) は細胞内へ必須アミノ酸を供給する輸送系 L トランスポーターであり、脳、胎盤、精巣、骨髄、血液・脳関門などに分布していることが報告されている。LAT1 は Leu, Ile, Phe, Met, Tyr, His, Try, Val などの中性アミノ酸を輸送する機能を持ち、腫瘍細胞や新生細

胞など活発に増殖する細胞の増殖に必須である。このような事実から、同じく血管平滑筋細胞の増殖が重要な病態である冠動脈形成術後の新生内膜形成や、脱分化して増殖性の高まった血管中膜平滑筋細胞が内膜へ遊走し増殖することが重要な粥状動脈硬化病変の形成に LAT1 が重要な可能性を果たすことが想定される。

2. 研究の目的

腫瘍細胞や新生細胞と同様、LAT1は血管平滑筋細胞の増殖に必須のトランスポーターであること、したがって、血管障害後の新生内膜形成や、粥状動脈硬化病変の形成に関わっていることが予想される。本研究では、血管壁細胞におけるLAT1の発現とその効果を検討し、続いて大動脈におけるLAT1の発現と血管障害後の発現動態の変化とその作用をLAT1阻害薬を用いて検討する。さらに、動脈硬化巣の形成や大脳虚血病変の出現におけるLAT1の関与についても検討を行った。

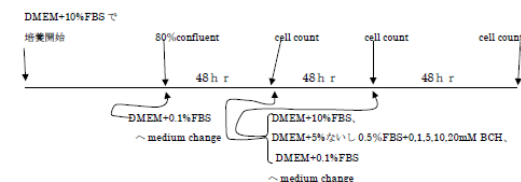
3. 研究の方法

(1) 細胞培養

Wistar ラットの動脈由来の血管平滑筋細胞(VSMC)のstockを実験に使用した。培地には10% Fetal Bovine Serum (FBS)を含む、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を用い、5%CO₂条件下にて37°Cで培養した。また、実験に応じて、FBSの濃度を変更し、また培地にBCHを添加した。

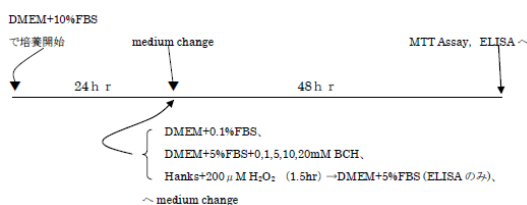
(2) 細胞増殖実験

下記のタイムコースのように、VSMCを24well plateを用いて培養(DMEM+10% FBS)し、80% confluent になったことを確認したのち、DMEM+0.1%FBSにmediumを交換した。その2、4、6日後にmedium交換を行い、Trypan Blue染色法による細胞数算定を行った。



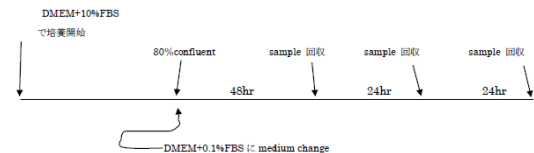
(3) 細胞死 (アポトーシス) の測定

VSMCを24well plateを用いてDMEM+10% FBSにて24時間培養後、medium交換し、下図のタイムコースにしたがって培養後、sampleの調整を行った。MTT AssayによりBIO RAD社製 Micro plate reader Model 680を用いてOD:595nmの波長で、分光度測定を行った。また、これと並行して3cm dishを用いて同様のタイムコースで培養を行い、sampleを調整した。そして、ELISA kitを用いてアポトーシスの定量を、Micro plate reader (OD:405nm)を用いて測定した。この際、H₂O₂による酸化ストレスによるアポトーシス誘導との比較実験も行った。



(4) Western Blotting

10cm dishで培養したVSMCならびに、大動脈(Aorta)、脳(Brain)、胎盤(Placenta)の各組織をホモジナイズして得られたsampleを、必要に応じて超遠心、カラム濃縮法により調整した。その後、タンパク濃度を測定し、一定タンパク量に含まれるLAT1の発現量をWestern Blotting (WB)法により比較した。また、下記のタイムコースに従い10cm dishでVSMCを培養し同様の方法で、LAT1発現量の経時的变化を調べた。



(5) バルーン障害後新生内膜肥厚に対するLAT1阻害薬の効果

Wistar 雄性ラットの頸動脈にバルーン障害を施したのち、LAT1阻害薬BCHをpluronic gelを用いて障害部位に局所投与した。バルーン障害14日後に頸動脈を採取し、パラフィン切片作成後、Elastica van Gieson染色を行った。染色した組織標本から新生内膜および中膜の断面積を計測し、内膜/中膜比(I/M ratio)を求めた。

また、新生内膜における細胞増殖能を確認するために、BrdU取り込み実験を行った。具体的にはバルーン障害6日後にBrdUを腹腔内投与し、その24時間後に障害血管を取り出し標本作製を行った。BrdUの検出にはCell proliferation kit(Amersham)を用い、内膜および中膜におけるBrdU陽性細胞数を計測した。

(6) LAT1欠損マウスに対する大腿動脈wire障害モデル

LAT1ヘテロ欠損マウス(ホモ欠損マウスは胎生致死)を作成し、Sataらの方法に従い(Sata M. J Mol Cell Cardiol 2000)、cookストレートガイドワイヤを用いて11~14週齢の雄性マウス大腿動脈に対してwire障害を行った。障害28日後に血管を取り出し標本作製、染色後、新生内膜および中膜の断面積を計測し、I/M ratioを求めた。

(7) 長期飼育動物における動脈硬化病変の評価

LAT1欠損マウスホモ接合体は胎生致死となるため、ApoE欠損マウスとの掛け合わせによって、生後の血管障害病変をみることは不可能である。そこで、ヘテロ接合体とのバッククロスを進めている。ApoE欠損マウスは20~48週齢で大動脈付近に顕著な粥状動脈硬化病変を形成することがわかっており、ApoEおよびLAT1のダブルノックアウトマウスで

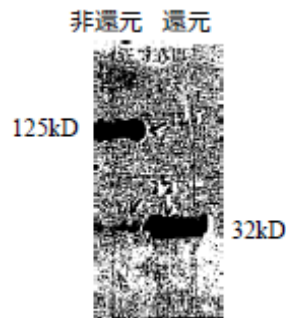
も同様あるいは軽度の血管変性がみられるものと予想される。そこで同様に20~48週齢時点で大動脈の展開標本および胸部上行大動脈起始部の横断標本を作成した後 Oil red O 染色ならびに必要な免疫染色を施行し、粥腫面積の定量を病変の質的評価を行う。

(8) マウス脳低還流による大脳白質障害モデルの作製

脳における慢性低還流モデルを作成し、脳が高発現部位である LAT1 への影響を検討する。具体的には Shibata らの方法に従い (Shibata M. Stroke 2004)、マウスの両側頸動脈露出後、内径 0.18mm、長さ 2.5mm の極小コイルを頸動脈周囲に巻きつけることで頸動脈を狭小化し、脳を通常の 70% 程度の慢性低還流状態にする。術後 30 日後付近で脳を取り出し標本作製、Kluver-Barrera 染色にて関心領域の脱髓病変の確認・スコア化を行う。ならびに各種免疫染色を行い、病変の性質についても評価する。

4. 研究成果

(1) 培養血管平滑筋細胞 (VSMC) における LAT の発現：通常の条件 (DMEM+10%FBS) で培養したラット大動脈 VSMC (RASMC) における LAT1 の発現を抗 LAT1 特異抗体を用いて Western blot によって検討したところ、非還元下で 125kD の位置に、還元下で 32kD の位置に (4F2hc とのヘテロダイマーが外れるため)、LAT1 の特異バンドが認められ、本細胞において LAT1 が発現していることを確認した。



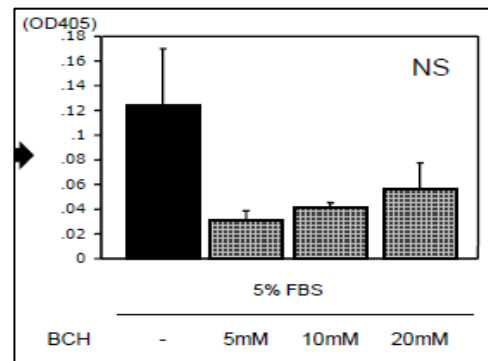
(2) 培養血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖に対する LAT の関与

① VSMC の増殖に対する LAT1 阻害薬 BCH の効果：5% の血清刺激によっておこる RASMC の増殖に対して、LAT 阻害薬である BCH を添加したところ、濃度依存的に (5, 10, 25 mmol/L)、

添加 2, 4 日後の細胞数の増加が抑制された。② VSMC の生存性に対する LAT1 阻害薬 BCH の効果：細胞生存性を MTT assay で評価したところ、同じ BCH の濃度で (1, 5, 10, 20 mmol/L) 細胞生存は低下した。

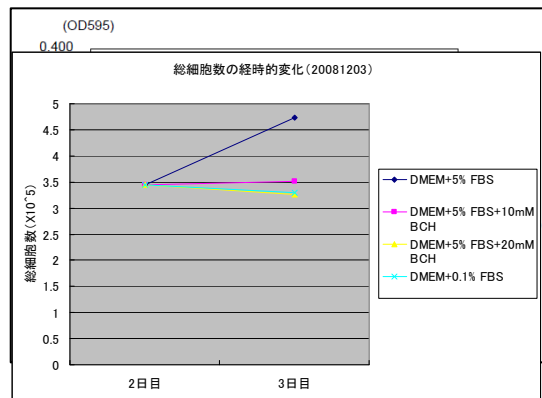
このことから、LAT1 は RASMC の増殖と生存性に必要なトランスポーターと考えられる。

③ VSMC のアポトーシスに対する BCH の効果：上記の結果を踏まえて、BCH による RASMC に対するアポトーシスの影響を定量的 ELISA



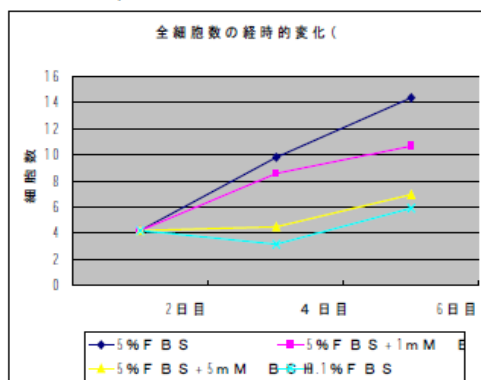
により検討した。その結果、BCH 5, 10, 20 mmol/L を添加しても RASMC のアポトーシスに有意な増加は見られなかった。

(3) 培養内皮細胞の増殖に対する LAT の関与：5% の血清刺激によるウシ頸動脈内皮細胞 (BAEC) の増殖に対して、BCH 10, 20 mmol/L を同時添加し、3 日後の細胞数を調べたところ、平滑筋細胞と同様、いずれの濃度でも

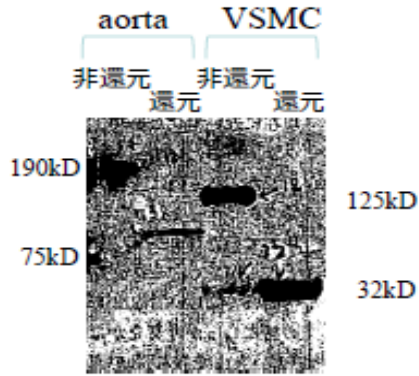


BAEC の細胞増殖に抑制が認められた。

($\times 10^5$ cells/ml)



(4) バルーン傷害後内膜肥厚におけるLATの発現：
 雄性 Wistar ラットの頸動脈を採取し、LAT1の発現を



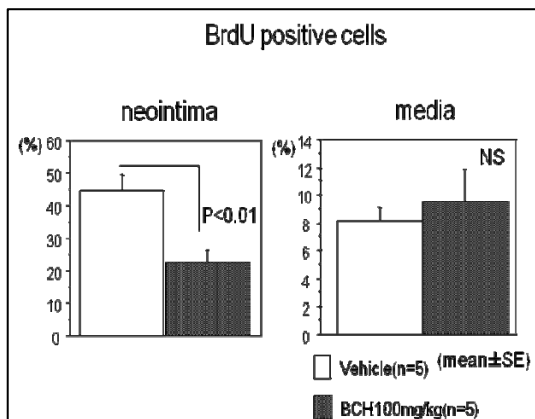
Western blot で調べた結果、190kD の位置 (非還元下) と 75kD の位置 (還元下) に LAT1 のバンドが認められた。

また、総頸動脈にバルーン傷害を施し、形成される

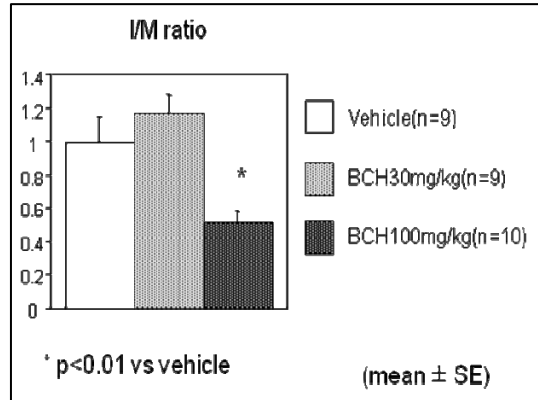
新生内膜における LAT1 mRNA の発現を real time PCR

によって調べた結果、障害 7 日後に LAT1 mRNA の発現が増加することを確認した。

(5) バルーン障害後内膜肥厚に対する LAT1 阻害薬の効果：ラットの頸動脈にバルーン障害を施し、同時に LAT1 阻害薬 BCH を pluronic gel を用いて障害部位局所に投与した結果、障害 14 日後の血管の新生内膜部分の面積は BCH 100 mg/kg の投与によって対照群 (vehicle 投与群) の約 40% に低下した。



さらに、新生内膜部分での細胞増殖を BrdU 取り込み実験で確認した結果、同様に BrdU の取り込みは対照群の約 40% に低下した。すなわち、LAT1 を阻害することによってバルーン障害による内膜増殖は抑制されることが判明した。



(6) LAT1 欠損マウスを用いた血管障害後内膜肥厚に対する LAT1 の効果の検討：11~14 週齢の LAT1 ヘテロ欠損マウスの大動脈にワイヤー障害を施すことで内膜肥厚を誘発し、処置 28 日後の血管内膜肥厚の状態を対照マウス (C57BL/6) と比較した。その結果、内膜/中膜比は対照群 2.05 に対し欠損群 1.65 で、有意差は認められなかった。今後さらに数を増やして検討する予定である。

(7) ApoE欠損マウスの動脈硬化病変の形成におけるLATの役割に関する検討：LAT1欠損マウスホモ接合体は胎生致死となるため、ApoE欠損マウスとの掛け合わせによって、生後の血管障害病変をみることは不可能である。そこで、ヘテロ接合体とのバッククロスを進めている。今年度中には実験を行うほどマウスを増やすには至らなかった。今後、掛け合わせを進め、必要な数が揃ったら、20~48週齢の時点で大動脈展開標本と胸部上行大動脈起始部の粥腫面積と病変の質的評価を行う予定である。

(8) 虚血による大脳白質障害モデルの構築：当初ラット頸動脈を両側結紮することで大脳虚血病変の作成を試みたが、実際には白質病変をうまく作成するには至らなかった。そこで手法を変えて、C57BL/6マウスの両側頸動脈を極小コイルで狭め、血流を低下させるよう試みた。その結果、Kluver-Barrera染色でcorpus callosumその他の関心領域に脱髄所見を認め、虚血白質病変ができたと考えられた。今後、本モデルを用いてLAT1の発現、分布等を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計30件)

1. Fukai S, Akishita M, Yamada S, Hama T, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Toba K, Ouchi Y. Association of plasma sex hormone levels with functional decline in elderly men and women. *Geriatr Gerontol Int.* 2009;9:282-9. 査読有
2. Kikuchi R, Kozaki K, Iwata A, Hasegawa H, Toba K. : Evaluation of risk of falls in patients at a memory impairment outpatient clinic. *Geriatr Gerontol Int.* 2009;9:298-303. 査読有
3. Moriya Y, Kozaki K, Nagai K, Toba K: Attenuation of brain white matter hyperintensities after cerebral infarction. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30:E43. 査読有
4. 鳥羽研二, 守屋佑貴子, 中居龍平, 岩田安希子, 小林義雄, 園原和樹, 長谷川浩, 神崎恒一. アルツハイマー型認知症の意欲の低下に対するコリンエステラーゼ阻害薬の効果. *日老医誌* 2009;46:269-70. 査読有
5. 里村元, 小林義雄, 神崎恒一, 八反丸美喜子, 田中政道, 佐藤道子, 守屋佑貴子, 井上慎一郎, 長谷川浩, 鳥羽研二. II型呼吸不全を契機に診断された運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia with motor neuron disease) の1例. *日老医誌* 2009;46:557-61. 査読有
6. 神崎恒一: 白質病変と転倒. *Geriatric Medicine*. 東京, ライフサイエンス, 2009, p697-702. 査読無
7. 神崎恒一: サイトカインと成長因子. 動脈硬化予防. 東京, メジカルビュー社 2009, p24-30. 査読無
8. 神崎恒一: 老年症候群の治療薬と薬剤起因性老年症候群 ふらつき・転倒. 月刊レジデント 東京, 医学出版 2009, p34-38. 査読無
9. 神崎恒一: 老年者の運動指導は? 肥満と糖尿病. 東京, 丹水社, 2009, p857-858. 査読無
10. 神崎恒一: 高齢者の転倒予防. *日本老年医学会雑誌*. 東京, 2009, p137-139. 査読無
11. Kawashima Y, Akishita M, Hasegawa H, Kozaki K, Toba K: Stress-induced blood pressure elevation in subjects with mild cognitive impairment: effects of the dual-type calcium channel blocker, cilnidipine. *Geriatr Gerontol Int.* 2008;8:278-83. 査読有
12. Sonohara K, Kozaki K, Akishita M, Nagai K, Hasegawa H, Kuzuya M, Yokote M, Toba K: White matter lesions as a feature of cognitive impairment, low vitality, and other symptoms of the geriatric syndrome in the elderly. *Geriatr Gerontol Int.* 2008;8:93-100. 査読有
13. Son BK, Akishita M, Iijima K, Kozaki K, Maemura K, Eto M, Ouchi Y: Adiponectin Antagonizes Stimulatory Effect of TNF{alpha} on Vascular Smooth Muscle Cell Calcification: Regulation of Gas6-Mediated Survival Pathway by AMP-Activated Protein Kinase. *Endocrinology.* 2008;49:1646-53. 査読有
14. Yu J, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Okabe T, Ouchi Y. : Raloxifene analogue LY117018 suppresses oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis through activation of ERK1/2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2008;589:32-6. 査読有
15. 小川純人, 山田思鶴, 浜達哉, 神崎恒一, 秋下雅弘, 大内尉義, 鳥羽研二: 骨粗鬆症予防に対する地域在住高齢者を対象とした転倒予防運動教室の効果に関する研究. *Osteoporosis Japan* 16:671-675, 2008. 査読有
16. 園原和樹, 鳥羽研二, 中居龍平, 小林義雄, 守屋佑貴子, 長谷川浩, 神崎恒一, 松田博史: 認知症高齢者の意欲低下に関連する脳血流分布. *日老医誌* 45:615-621, 2008. 査読有
17. 菊地令子, 神崎恒一, 川島有実子, 岩田安希子, 長谷川浩, 井形昭弘, 鳥羽研二: 運動習慣を有する高齢女性における転倒リスク. *日老医誌* 45:526-531, 2008. 査読有
18. 神崎恒一. 村田久, 菊地令子, 杉山陽一, 長谷川浩, 井形昭弘, 鳥羽研二. 活力度指標の信頼性, 妥当性および、活力度指標と加齢, 運動との関連性に関する検討. *日老医誌* 45:188-195, 2008. 査読有
19. Tanaka K, Yamada Y, Kobayashi Y, Sonohara K, Machida A, Nakai R, Kozaki K, Toba K. Improved cognitive function, mood and brain blood flow in single photon emission computed tomography following individual reminiscence therapy in an elderly patient with Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int.* 7:305-9, 2007. 査読有
20. Xi H, Akishita M, Nagai K, Yu W, Hasegawa H, Eto M, Kozaki K, Toba K: Potent free radical scavenger,

edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007;191:291-9. 査読有

21. Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y: Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2007;556:1-8. 査読有
22. 平山俊一、菊地令子、井上慎一郎、塚原大輔、末光有美、小林義雄、杉山陽一、長谷川浩、神崎恒一、井上剛輔、鳥羽研二. 超高齢者におけるクレアチニンクリアランス推定式の比較検討. *日老医誌* 44:90-94, 2007. 査読有
24. 神崎恒一: 動脈硬化症とアルツハイマー型認知症. *老年精神医学雑誌* 18:1083-90, 2007. 査読無
26. 神崎恒一, 永井久美子: 動脈硬化患者へのアプローチ法 動脈硬化をきたした高齢者の診療. *Medicina* 44:1476-80, 2007. 査読無
29. 神崎恒一: 循環器疾患の老年医学 QOL を見据えた循環器疾患の管理. *日老医誌* 44:711-3, 2007. 査読無
30. 神崎恒一, 永井久美子, 鳥羽研二: 高齢者循環器疾患に合併した認知症と QOL. *循環器科* 2007;61:55-60. 査読無

[学会発表] (計 15 件)

1. 神崎恒一. これから認知症診療を始める医師のための基礎講座 (ワークショップ) 認知症患者の ADL. 第 28 回認知症学会 2009 年 11 月 21 日. 仙台
2. 神崎恒一. 高齢者糖尿病と認知症 運動による認知機能の改善効果 (シンポジウム). 第 24 回糖尿病合併症学会 2009 年 10 月 9 日. 岡山
3. 神崎恒一. 高齢者の転倒予防 (教育講演). 第 51 回日本老年医学会 2009 年 6 月 19 日. 横浜
4. 神崎恒一. 虚弱高齢者の評価と対応 (シンポジウム). 第 9 回抗加齢医学会 2009 年 5 月 28 日. 東京
5. 神崎恒一, 鳥羽研二: 高齢者の日常生活機能と男性ホルモン (シンポジウム). 第 8 回日本 Men's Health 医学会, 平成 20 年 11 月 30 日, 東京
6. 神崎恒一, 永井久美子, 鳥羽研二: 脳皮質下虚血病変と脈波伝播速度との関連. 第 40 回日本動脈硬化学会, 平成 20 年 7 月 11 日, つくば市
7. 神崎恒一, 山田如子, 木村紗矢香, 永井

久美子, 田中克明, 菊地令子, 川島有実子, 長谷川浩, 鳥羽研二: 高齢者の日常生活機能と男性ホルモンの関係. 第 50 回日本老年医学会, 平成 20 年 6 月 21 日, 千葉市

8. 神崎恒一 (シンポジウム): 酸化ストレスを標的とした血管障害の治療に関する研究. 第 50 回日本老年医学会, 平成 20 年 6 月 21 日, 千葉市
9. 永井久美子, 神崎恒一, 橋本正良, 秋下雅弘, 鳥羽研二: 非侵襲的動脈硬化検査法の心血管系イベント予測因子としての有用性. 第 39 回日本動脈硬化学会総会, 平成 19 年 7 月 13 日, 大坂
10. Kozaki K: Effect of exercise on healthy elderly individuals Symposium of Geriatric Medicine. -Metabolic syndrome in old age-Taipei, May 26, 2007. Taipei
11. Kozaki K: Approach to cognitive dysfunction and subcortical ischemia. SNU Advanced Training Course for Gerontology and Geriatrics By Asia Oceania Region of International Association of Gerontology and Geriatrics, Aug 18, 2007. Seoul

[図書] (計 5 件)

1. 神崎恒一: ワールドプランニング、老年医学の基礎と臨床 I, 2008, p224-226.
2. 神崎恒一: メジカルビュー社、老年医学テキスト, 2008, p87-90.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 恒一 (KOZAKI KOICHI)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号: 80272540

(2) 研究分担者

永井 久美子 (NAGAI KUMIKO)
杏林大学・医学部・実験助手
研究者番号: 60398592
(H19→H20: 連携研究者)